مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۹۶

آخرین دستاوردها در ارتقاء وضوح میکروسکوپ نوری: روزنه‌ای برای مشاهدات زیستی در مقیاس نانو

علی دیناری، الناز تمجید*
گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
tamjid@modares.ac.ir

چکیده

ظهور نانوفناوری به‌عنوان یک فناوری نوین با افق‌های امیدبخش، همواره با نگرانی‌هایی در زمینه‌ی ایمنی زیستی و زیست‌محیطی همراه بوده است. به‌ویژه آنکه این فناوری با دستکاری مواد در مقیاسهای سلولی و مولکولی، ادعای بهبود عملکرد سامانه‌های زیستی با اهداف پزشکی و زیست‌فناورانه را مطرح می‌سازد. لذا اطمینان از سلامت این نانوسامانه‌ها براساس مشاهده مواد و اجزای زیرسلولی و مطالعه دقیق ساز و کارهای عملکرد زیستی آن‌ها در مقیاس نانومتری ضروری به نظر می‌رسد. مزیت میکروسکوپ نوری به‌عنوان ابزاری مهم در توسعه علوم، امکان مشاهده نمونه‌های زنده با حداقل اختلال در عملکرد آن‌ها، انعطاف‌پذیری، حساسیت و اختصاصیت است. اما پراش نور و تاثیر آن بر وضوح، محدودیت اصلی این میکروسکوپ‌هاست. اخیرا با توسعه روشهای جدید تصویربرداری با وضوح بسیار بالا مبتنی بر مولکول‌های حاوی عوامل نشانگر ساختاری به عنوان یک منبع نوری نانومقیاس، شکاف بین قدرت تفکیک میکروسکوپ فلورسنت و الکترونی کاهش چشمگیری یافته است. تصاویر حاصل از این روش‌ها، حاوی اطلاعات ارزشمندی در بررسی کروموزوم، نقشه‌یابی ژنوم، انتقالات غشایی، تقسیم سلولی، آلودگی‌های ویروسی و سمیت سلولی است. در این مقاله آخرین پیشرفت‌های فناورانه در بهبود وضوح میکروسکوپ‌های نوری به مقیاس نانو با امید ارتقاء دانش عمومی در حوزه‌های مختلف پزشکی و زیست‌شناسی معرفی می‌شوند.

کلمات کلیدی: میکروسکوپ نوری فلورسنت، وضوح ، پراش، مقیاس نانو، ایمنی زیست

مقدمه

میکروسکوپ نوری به عنوان یکی از ابزارهای مهم در توسعه علم و فن آوری در نظر گرفته شده است. از زمان اختراع آن در اواخر قرن شانزدهم، این شهرت را بدست آورد که قادر به نمایان کردن اشیائی باشد که با چشم غیر مسلح قابل دیدن نیست. از این رو انواعی از رشته‌های علمی از قبیل بیولوژی، پزشکی، و علم مواد شکل گرفت. توانایی این تکنیک برای اندازه‌گیری ریخت شناسی سطح، طراحی مرز میکروساختارها و مکان‌یابی اختصاصی مولکوهای توزیع شده در شرایط in vivo ناشی از تحقیقات

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

مدرن و پیشرفت‌های این ابزار است. در واقع بدون میکروسکوپ نوری دانش ما در مورد دنیای میکرو به شدت مختل می‌شد. با گذشت ۳۰۰ سال از زمان اختراع میکروسکوپ نوری موضوع پراش نور و تاثیر بالقوه آن بر قدرت تفکیک به صورت کاملا جدی باقی مانده است. کمترین فاصله بین دو نقطه را که به وضوح به‌عنوان موجودیت‌های جداگانه، با میکروسکوپ دیده شود قدرت تفکیک می‌نامند که به دو عامل طول موج نور مرئی و عدد ضریب دهانه (NA= Numerical aperture) عدسی شیئی سیستم مورد استفاده بستگی دارد. بنابراین حد نهایی تفکیک میکروسکوپ‌های نوری طول موج نور مرئی (۴۰۰ تا ۷۲۰ نانومتر) است. آقای ارنست ابه در سال ۱۸۷۳ به طور واضحی نشان داد که محدوده وضوح یک میکروسکوپ حدود نصف طول موج اصلاح شده با ضریب دهانه عدسی شیئی می‌باشد (۱). در واقع به دلیل ماهیت موجی نور، موج‌های مختلف موجود در یک پرتو نور، با یکدیگر تداخل می‌کنند. به همین دلیل، تمرکز پرتو نور توسط یک عدسی، بسته به طول موج نور و زاویه‌ای که عدسی می‌تواند نور را جمع آوری کند، یک نقطه نورانی به پهنای ۲۰۰ نانومتر در جهت‌های X و Y و عمق ۵۰۰ نانومتر در راستای Z تشکیل می‌دهد. میکروسکوپ فلورسنت میدان دور (FFFM) از انواع پیشرفته میکروسکوپ‌های نوری است. تقدم و پیشتازی این نوع میکروسکوپ به علت مزایای منحصر به‌فرد آن از جمله توانایی کار با نمونه‌های زنده، حساسیت و اختصاصیت فوق‌العاده زیستی، حداقل اختلال در عملکرد نمونه زنده، نمایش مستقیم و نمایان کردن نمونه، انعطاف پذیری و سادگی کار کردن با آن است. بنابراین FFFM یک وسیله ترجیحی برای بررسی موقعیت مکانی اجزای سلول است. با این وجود پراش ذاتی ابه به عنوان یک مانع قدرت مانور میکروسکوپ نوری برای دریافت اطلاعات مهم ریخت‌شناسی و مکان‌یابی اجزای سلولی محسوب می‌شود. اخیرا چندین تکنیک تصویربرداری با وضوح عالی توسعه یافته‌اند (٦-۲) که با کمک آن‌ها برای سوالهای زیستی حل نشده، جواب‌های جدیدی بدست آمده است. در این مقاله آخرین دست‌آوردهای علمی در زمینه دستیابی به وضوح عالی مورد بررسی قرار می‌گیرد. همان‌گونه که ذکر شد پراش محدود کننده وضوح فضایی است که به‌ترتیب در جهت وضوح جانبی (Lateral Resolution) به ۲۰۰ نانومتر و در جهت وضوح محوری (Axial Resolution) به ۵۰۰ نانومتر محدود شده است. بدین ترتیب مانعی برای کاربرد میکروسکوپ نوری در شناسایی جزییات ظریف ساختارهای ریز سلولی ایجاد کرده است. تلاش‌های گسترده‌ای برای غلبه بر محدودیت پراش و بدست آوردن تصویربرداری با وضوح در زیر محدوده پراش بر روی نمونه‌های بیولوژیکی صورت گرفته است. روش‌های زیادی ابداع شده اند که قادرند تصویرهایی با وضوح دلخواه در ابعاد ۱۰ نانومتر یا کمتر ایجاد

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

کنند. به طور کلی تکنیک‌های با وضوح بسیار بالا (Super-Resolution Imaging) به ۳ نوع اصلی تقسیم می‌شوند.

اولین نوع از روش‌های تصویربرداری با وضوح بسیار بالا مبتنی بر نور الگو یافته است. این روش از طریق روشنایی الگو یافته وضوحی در زیر محدوده پراش را برای کنترل فقط چند مولکول که به‌طور همزمان برانگیخته و آشکار می‌شوند، حاصل می‌کند. از جمله روش‌های میکروسکوپی این گروه می‌توان به STED microscopy، RESOLFT technology و SSIM اشاره کرد.

نوع دوم روش‌های تصویربرداری با وضوح بالا مبتنی بر مکان یابی (محلی‌سازی) تک مولکول است که مولکول‌های منفرد (مستقل) را در زمان‌های متفاوت فعال می‌کند. این گروه به طور عام شامل STORM و PALM است.

نوع سوم روش‌های تصویربرداری بر پایه بی‌رنگ شدن (Bleaching)و چشمک زدن (Blinking) است که شامل تصویربرداری با وضوح عالی مبتنی بر تک مولکول‌های فلورسنت به واسطه بی‌رنگ شدن نوری (SHRImP)، مکان‌یابی تک مولکول‌های سیگنال دهنده توسط بلیچ شدن /چشمک زدن (BaLM) و همچنین روش تصویربرداری با وضوح عالی توسط نوسانات نوری (SOFI) است. در ادامه هر کدام از روش‌های فوق‌الذکر به اختصار مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد.

تصویربرداری با وضوح بسیار بالا مبتنی بر نور الگو یافته

الف- میکروسوپ STED

در میکروسکوپ STED (کاهش نشر تحریک شده) به طور مستقیم با کاهش تاثیر تابع نقطه گستر (Point-spread function (PSF) میکروسکوپ از طریق خاموش نگه داشتن مولکول بین حالت فلورسنت و غیر فلورسنت محدودیت پراش را می‌شکند. لازم است قبل از معرفی این روش میکروسکوپی تابع نقطه گستر توضیح داده شود. اگر یک ذره با اندازه‌ای کوچکتر از حد تفکیک میکروسکوپ به‌عنوان مثال یک پرتو فلورسنت با قطر ۲۰۰ نانومتر در نظر گرفته شود، هنگام تهیه تصویر از این ذره، ابتدا آن را با نور برانگیخته کرده و سپس با استفاده از یک لنز فوتون‌ها به دوربین هدایت می‌شود. این پرتو فلورسنت به عنوان نقطه منبع برای فوتون‌ها در نظر گرفته می‌شود. در حالت ایده‌آل تصویر ایجاد شده باید به‌صورت یک نقطه (فقط یک نقطه) به عنوان ذره (bead) دیده شود. اما در عمل تعدادی از فوتون‌ها پراکنده شده و آن‌چه در تصویر دیده می‌شود، به‌صورت اسمیر (هاله) در اطراف مکان مربوط به پرتو فلورسنت متمرکز شده ظاهر می‌شود. این اسمیر یا به‌عبارتی پاسخ میکروسکوپ به نقطه منبع فوتون‌ها تابع نقطه گستر نامیده می‌شود. در واقع عمل تابع نقطه گستر باعث محدود کردن وضوح می‌شود. به این صورت که در

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

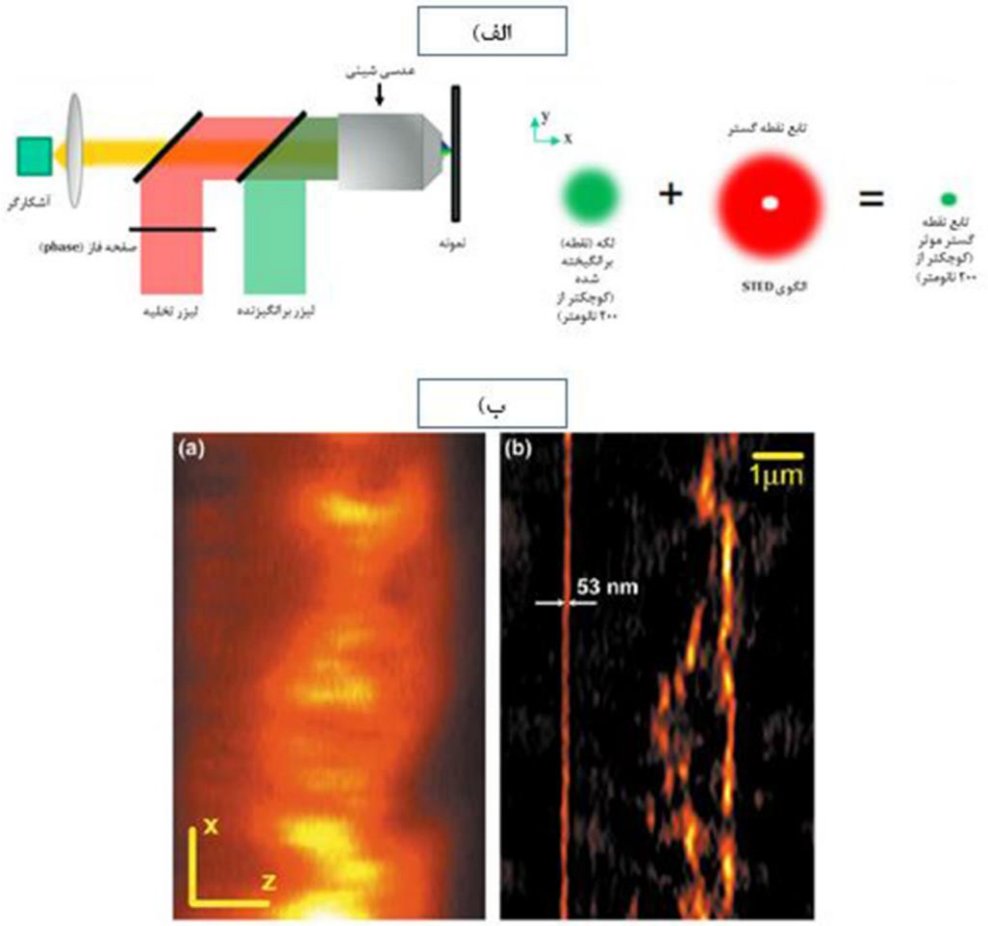
[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

نظر بگیرید دو ذره نزدیک به هم (در فاصله کمتر از نصف طول موج) پس از ترکیب شدن تابع نقطه گستر آن‌ها، در تصویر تولید شده ایجاد اسمیر کرده و به صورت یک ذره ظاهر می‌شود (۷). به‌عبارت دیگر دو فلوروفور یکسان که توسط یک فاصله کمتر از عرض تابع نقطه گستر جدا شده‌اند، تصویر امتزاج یافته‌ای تولید خواهند کرد که آنالیز آن دشوار یا حتی غیر ممکن است. بنابراین وضوح نهایی میکروسکوپ، توسط عرض تابع نقطه گستر محدود می‌شود. در میکروسکوپ نوری STED فلورفورها به وسیله پرتو لیزری متداول (لیزر برانگیزنده) برانگیخته شده و به دنبال آن توسط لیزر تخلیه ثانویه (STED laser) با یک الگوی پرتو دونات شکل (حلقه‌ای) متاثر می‌شوند (شکل ۱). در این تکنولوژی لیزر STED برعکس لیزر اول عمل می‌کند و مولکول‌های برانگیخته اطراف نقطه کانونی را به حالت غیر برانگیخته برگردانده و بدین طریق فقط پرتو فلورسنسی که از مولکول‌های قرار گرفته در ناحیه مرکزی زیر محدوده پراش ساطع می‌شوند، در ایجاد تصویر شرکت می‌کنند. به عبارت دیگر، اگر مولکول‌ها در نقطه کوچکی از نمونه در حالت روشن (on) باشد و یک پرتو دونات شکل (شیرینی حلقه‌ای) حوالی این نقطه در حالت خاموش (off) باشد، نقطه موثری که از آن پرتو فلورسنت بازتابیده می‌شود، بسیار کوچکتر می‌شود. در حقیقت با استفاده از این میکروسکوپ‌ها دستیابی به قدرت تفکیک در مقیاس ده‌ها نانومتر امکان‌پذیر شده است. اگر در این روش از پروتئین‌ها یا رنگ‌های قابل کلید زدنی با نور (Photoswitchable) استفاده شود، به قدرت تفکیک بیشتری نیاز نیست.

تئوری این روش میکروسکوپی به این صورت است که فرآیند برگشت به حالت پایه (De-excitation) به واسطه نشر تحریک شده بدست می‌آید (۸). زمانی که مولکول فلورفور در حالت برانگیخته با یک فوتون که انرژی متناسبی با آن دارد، برخورد می‌کند، این مولکول برانگیخته انرژی خود را از دست داده و از طریق نشر تحریک شده (قبل از اینکه نشر فلورسنس به طور خودبه خود اتفاق بیافتد)، به حالت پایه برمی‌گردد (۹).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]



شکل ۱– الف) طرح‌واره چگونگی عملکرد میکروسکوپ STED. مقایسه تصویر میکروتوبول‌های کلیه جنین انسان که با رنگ MR 121 SE نشاندار شده است با میکروسکوپ کانفوکال (a) و میکروسکوپ STED. استخراج شده از منبع (۱۰).

همزمان مولکول‌های پوشیده شده به وسیله لیزر دوم از حالت برانگیخته به حالت پایه برمی‌گردد، در حالی که مرکز آن هنوز به صورت خودبه خودی تشعشعات فلورسنت دارند. در این حالت تابع نقطه گستر به اندازه کافی کوچک بوده و طول موج‌های دیگر فلورسنس و پرتوهایی که برای آشکارسازی محدودیت ایجاد می‌کنند، مورد استفاده قرار نمی‌گیرند. بنابراین تصاویر ایجاد شده با وضوح بسیار بالا قابل دستیابی هستند. در انتخاب لیزر تخلیه ضروری است پارامترهایی مثل طول موج، شدت، و زمان تاخیر را به دقت انتخاب شود (۱۱). به‌عنوان مثال طول موج پرتو STED باید نسبت به پرتو برانگیزنده بلندتر باشد تا از برانگیزش مجدد توسط پرتو STED اجتناب شود. امروزه میکروسکوپ STED دو رنگ از طریق رهیافت متکی بر لیزرهای جداگانه برای هر فلورفور یا پروتئینهای فلورسنت قابل کلیدزنی با نور طراحی شده است (۱۴–۱۲). این میکروسکوپ به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تصویربرداری اتصالات فاصله (Gap junctions) و پرتئین ویمنتین (۱۵) و همین‌طور اکتین و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

وزیکول‌های سیناپسی در مشاهدات سلول‌های زنده (۱٦) به‌کار رفته است. وضوح اولین تصاویر گرفته شده با این میکروسکوپ در سلول‌های زنده ۷۸ نانومتر بوده است (۱۷).

ب- تکنولوژی RESOLFT

به دلیل نیمه عمر فلورسنس کوتاه (کمتر از ۵ نانوثانیه) و شدت خیلی بالای (بیشتر از $۱۰^{۹}$ طول موج /سانتی متر مربع) اغلب فلورفورها برای تصویربرداری با وضوح بسیار بالا توسط روش میکروسکوپی STED به لیزر تخلیه نیاز است (۹) (٤, ۱۸). با این وجود این لیزر با شدت بالا سبب بی رنگ شدن فلورفورها و یا آسیب به نمونه‌های بیولوژیکی می‌شود. از نظر تئوری چنانچه فلورفورها بتوانند از حالت پایای (Long-lived state) خود سوئیچ شوند، انرژی مورد نیاز برای ایجاد پرتو دونات شکل به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. این ایده اصلی میکروسکوپ RESOLFT بود (۱۹) که در آن از سوئیچ شدن بین حالات فلورسنت کم ثبات و تاریک مربوط به فلورفورها به جای نشر تحریک شده (گسیل القایی) استفاده می‌شود. تاکنون تعداد محدودی از انواع نشانگرهای (probe) قابل سوئیچ مقاوم به فرسایش (۲۰) که بتواند چندین مرتبه بین حالات تاریک و فلورسنت سوئیچ شود، گزارش شده است (۲۱). این امر یکی از موانع توسعه کاربرد RESOLFT در تصاویر مربوط به زیست شناسی است. در سال ۲۰۱۱ نوع جدیدی از پروتئین فلورسنت زرد رنگ (YFP) به نام Dreiklang معرفی شد که به وسیله‌ی یک ساز و کار کلیدزنی نوری جدید عمل می‌کند. مشابه با دیگر YFPها، پروتئین Dreiklang در ۵۳۰ نانومتر فلورسنت نشر می‌کند در حالی که برانگیختگی آن در ۵۱۵ نانومتر می‌باشد. ویژگی متمایز کننده این پروتئین از دیگر پروتئین‌ها این است که در ۳۶۵ نانومتر روشن (برخلاف طول موج‌های رایج در تصویربرداری با پروتئین‌های فلورسنت) و در ۴۰۵ نانومتر خاموش می‌شود. تصاویر به دست آمده با فلورسنت ناشی از پروتئین Dreiklang در مد میکروسکوپی RESOLFT با وضوحی در ابعاد کوچکتر از ۳۵ نانومتر تهیه شده که در مقایسه با تصاویر بدست آمده از روش‌های دیگر جزیئات بیشتری به همراه داشت (۲۲). شایان ذکر است که ابعاد ریبوزوم انسان به عنوان بیونانوماشین زیستی ۳۵ نانومتر، آنتی‌بادی‌ها ۱۲ نانومتر، tRNA حدود ۷ نانومتر، هموگلوبین ۶,۵ نانومتر و بسیاری از پروتئین‌های دیگر حدود ۲,۵ نانومتر است. بنابراین تصاویر بدست آمده از این روش‌های میکروسکوپی، به‌منظور بررسی ساختار و عملکرد مولکول‌های زیستی فوق‌الذکر مفید و کارآمد خواهند بود. پژوهش‌های بعدی، به معرفی پروتئین فلورسنت دیگری منجر شد که اصطلاحا آن را پروتئین فلورسنت سبز قابل سوئیچ برگشت‌پذیر (rsEGFP) نامیده‌اند که به بی‌رنگ شدن در اثر برخورد نور شدید مقاوم بوده و به طور چشم‌گیری قادر است تا بیش از ۱۰۰۰ چرخه قابل سوئیچ شدن خود را حفظ نماید. توزیع پروتئین‌های فلورسنت سبز قابل کلیدزنی برگشت پذیر امتزاج یافته با پروتئین‌های موجود در رده سلولی پستانداران و باکتری‌ها، تصاویری با وضوحی در ابعاد کوچکتر از ۴۰ نانومتر ایجاد نموده‌اند. در واقع فن‌آوری RESOLFT اصول به کار رفته در میکروسکوپ STED و میکروسکوپ GSD را با هم ادغام کرده است. در میکروسکوپ GSD نیز

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

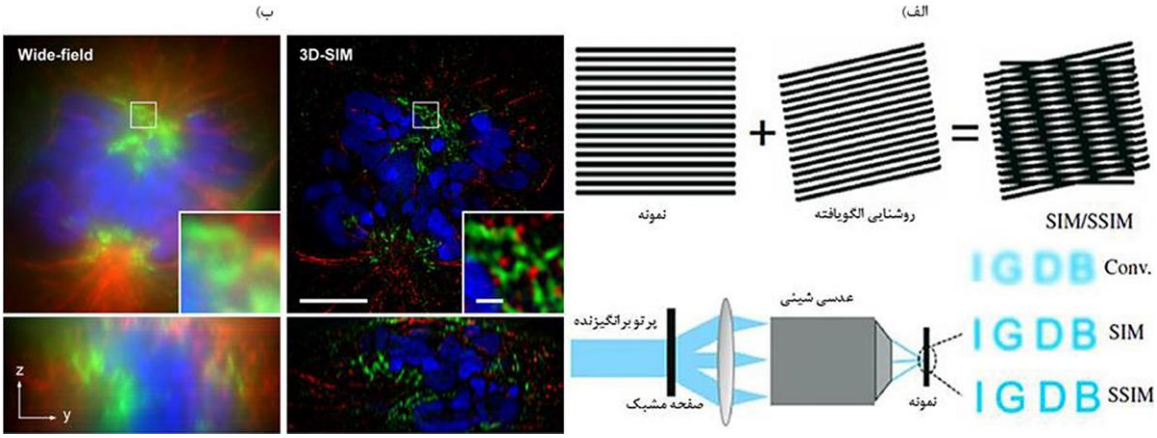
از نشانگرهای فلورسنت استفاده می‌شود. در شرایط استاندارد یک نشانگر قادر است آزادانه از حالت پایه برانگیخته شده و به صورت خود به خودی با نشر فوتون فلورسنت به حالت پایه برگشت کند. با این وجود اگر نور با طول موج مناسب به صورت اضافی اعمال شود مولکول رنگی می‌تواند به حالت طولانی عمر تاریک یعنی حالتی که فلورسانس رخ نمی‌دهد، (حالت ۳ گانه = Triplet-state) برانگیخته شود. تا زمانی‌که مولکول در حالت طولانی عمر قرار بگیرد، نمی‌تواند از حالت پایه برانگیخته شود. سویچینگ بین این دو حالت (تاریک و روشن) به وسیله اعمال نور تمام پیش فرض‌های لازم برای مفهوم RESOLFT را برآورده می‌کند و تصویربرداری زیر محدوده پراش و وضوح بسیار بالا را مهیا می‌کند.

ج- میکروسکوپ SSIM

در سال ۱۹۹۰ برای ارتقاء وضوح جانبی میکروسکوپ میدان دور از تکنیک تداخلی (Interferometric) در روش میکروسکوپی که اصطلاحا آن را میکروسکوپ نور ساختار یافته می‌نامیدند، استفاده شد. در روش میکروسکوپی SIM یک وضوح گسترش یافته از طریق اثر موير که از الگوی فرکانس فضایی سود می‌برد، بدست می‌آید. در واقع شکسته شدن محدودیت وضوح جانبی که به واسطه قانون فاکتور دو (Factor of tow) به دست می‌آید از روشنایی ساختار یافته فضایی در میکروسکوپ فلورسنت میدان گسترده سود می‌برد. این پدیده سبب می‌شود به اطلاعات با وضوح بسیار بالا که به طور معمول در تصویر قابل مشاهده نیست، دسترسی حاصل شود. تصویر گزارش شده در یک روند غیرخطی اطلاعات جدید استخراج و در تهیه تصویر بازسازی شده با وضوح عالی به کار برده می‌شود. مفهوم به کار رفته در روش میکروسکوپی نورتابی ساختار یافته به آسانی از طریق اثر موير قابل درک است. اگر دو الگوی معین بر هم منطبق باشند- یک الگوی ضربان- حاشیه موير در محصول برآیند ظاهر خواهد شد (۳). در میکروسکوپ SIM، نورتابی در سطح نمونه با نور الگویافته انجام شده و افزایش وضوح توسط اندازه‌گیری حاشیه‌ها در الگوی موير بدست می‌آید که خود ناشی از تداخل الگوی نورتابشی و پراش یافته نمونه است. میکروسکوپ SIM وضوح فضایی را از طریق جمع‌آوری اطلاعات از فضاهای بیرونی ناحیه قابل مشاهده، افزایش می‌دهد. این فرآیند در یک فضای متقابل (دو جانبه) انجام می‌شود. انجام معادلات فوریه ترانسفرم مربوط به تصویر بدست آمده از SIM حاوی اطلاعات اضافی از نواحی مختلف فضای متقابل هست. در روش میکروسکوپی SIM (شکل ۲) از دو رویکرد شامل پروتکل‌های اختصاصی و نرم‌افزارهای آنالیز کننده استفاده می‌شود.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

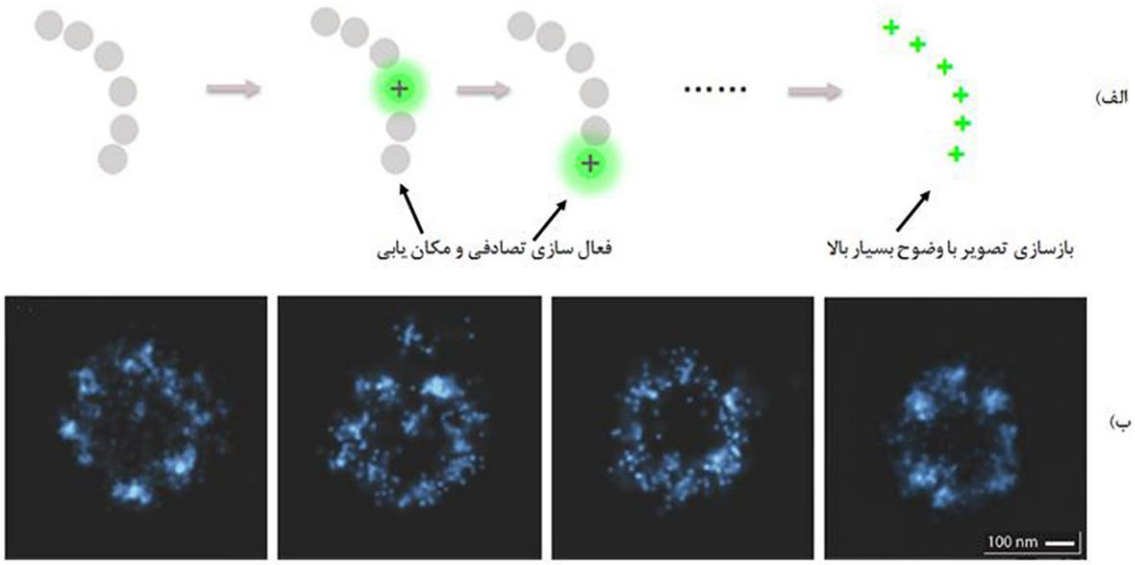


شکل ۲– الف) استفاده از تکنیک تداخلی (interferometric) و اثر moir'e در روش میکروسکوپی SSIM. ب) تصویربرداری با وضوح بسیار بالا از کروماتین هسته در مرحله پرومتافاز سلولهای C2C12 : تصویر سمت چپ توسط میکروسکوپ نوری میدان دور و تصویر سمت راست توسط میکروسکوپ 3D-SIM تهیه شده است. استخراج شده از منبع (۲۳).

در SSIM فلورفور از حالت برانگیخته به حالت پایه خالی می‌شود. این عمل از طریق نور تحریکی اشباع شده انجام شده و یک الگوی نشری سینوسی را ایجاد می‌کند که بر روی آشکارگر ثبت می‌شود. در نتیجه‌ی اثر غیرخطی، وضوح مناسبی بدست آمده و در ادامه تصویر با وضوح بسیار بالا بازسازی می‌شود. اگر چه از لحاظ تئوری وضوح SSIM نامحدود است، اما اثر فلورسنس غیرخطی با فرونشانی‌های شدید، بی‌رنگ شدن و پدیده اشباع شدن همراه است که کاربرد آن را در نمونه‌های زیستی به شدت محدود می‌کند. اخیرا پروتئین Dronpa که یک پروتئین فلورسنت قابل سوئیچ با نور هست، معرفی شده که وضوحی برابر ۴۰ نانومتر را روی میکروتوبول‌های خالص‌سازی شده برچسب دار ایجاد کرده است. امروزه با استفاده از این روش میکروسکوپی توانسته‌اند تصاویر با وضوح عالی از هسته و فرآیند تقسیم هسته تهیه کنند. تصویر برداری با وضوح بسیار بالا مبتنی بر مکان‌یابی تک مولکول (مولکول منفرد) بر پایه نشانگرهای قابل فعال شدن با نور هست که توسط لیزری با طول موج مشخص فعال و توسط لیزر دیگر به فلورسنس برانگیخته می‌شود. در این روش تصویربرداری برای فعال‌سازی تصادفی نشانگرهای قابل فعال شدن با نور (شکل ۳) در هر مرحله تعداد کمی از مولکول‌ها در هر شات (عکس) تصویربرداری برانگیخته شده و مرکز هر مولکول فلورسنت مستقل با استفاده از تابع گوسین مکان‌یابی می‌شود (۲٤).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]



شکل ۳- الف) طرح‌واره چگونگی عملکرد مکان‌یابی تک مولکول‌های فلورسنت. ب) تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ STORM از سانتریول‌های سلول‌های S_2 رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی MD و آنتی‌بادی ثانویه ANTI-RABBIT ترکیب شده با رنگ آلی ALEXA 647/ALEXA 405. استخراج شده از منبع (۲۵)

تصویربرداری با وضوح بسیار بالا با دقتی برابر با ده‌ها نانومتر از طریق ترکیب کردن صدها تا ده‌ها هزار از فریم‌های خام که هر یک حاوی فقط تعداد کمی مولکول منفرد هست بازسازی می‌گردد. مکان‌یابی این تک مولکول‌های مستقل با دقت زیاد برای بدست آوردن تصاویر با وضوح بسیار بالا مهم و حیاتی است. تخمین دقت مکان‌یابی با تعداد فوتون‌ها این فرصت را برای میکروسکوپ با وضوح عالی، فراهم می‌کند که محدودیت ناشی از پراش نور را مرتفع کند. از این رو مسئله مهم دیگر که باید مد نظر قرار گیرد، خصوصیات فیزیکوشیمیایی نشانگرهای قابل فعال شدن با نور است که در تصویربرداری با وضوح عالی مبتنی بر مکان‌یابی تک مولکول مورد استفاده قرار می‌گیرد. تعدادی زیادی از فلورفورهای قابل فعال شدن با نور از قبیل رنگ‌های آلی سنتزی و پروتئین‌های فلورسنت برای توسعه تصویر برداری با وضوح بالا ارائه شده‌اند (۲۶, ۲۷). به‌طور معمول در هر مرحله سوئیچ شدن این نشانگرها در حضور هزار فوتون عملکرد داشته و وضوح را تا ابعاد کمتر از ۲۰ الی ۱۰ نانومتر ارتقاء داده است.

الف- میکروسکوپ STORM

فن‌آوری STORM در سال ۲۰۰۶ توسعه یافته است (۲۸) که در آن تصویر نهایی از بازسازی تصاویر مربوط به مکان‌یابی مولکول‌های فلورسنت مستقلی که با استفاده از نور رنگ‌های مختلف روشن و خاموش می‌شود بدست می‌آید. میکروسکوپ STORM می‌تواند با دامنه‌ای از نشانگرهای قابل سوئیچ با نور شامل رنگها و پروتئین‌های فلورسنت (۲۹) به‌کار برده شود. در این روش میکروسکوپی از رنگ‌های سیانین، رودامین، رنگ‌های گرفتار شده در قفس‌های نانویی و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

رنگ‌های چشمک زن استفاده می‌شود (۲, ۵, ۳۰ و۳۲). اخیرا پژوهشگران خصوصیات سوئیچ شدن ۲۶ رنگ آلی و همین‌طور خصوصیاتی که به طور مستقیم با کیفیت تصویر با وضوح عالی مرتبط هستند کمی‌سازی نموده‌اند. علاوه بر رنگ‌های آلی ذکر شده از پروتئین‌های فلورسنت سوئیچ شونده با نور مانند mEos2 و ژن مربوط به پروتئین‌های فلورسنت (PA-GFP) در تصویربرداری روش میکروسکوپی STORM استفاده شده است (۳۵-۳۳). نکته‌ای که بیان آن لازم است این‌که زمانی که نشانگرهای فلورسنت برای روش میکروسکوپی STORM انتخاب می‌شوند، خصوصیات آن‌ها شامل فوتون‌های لازم برای هر سوئیچ شدن، بازده چرخه‌های خاموش و روشن شدن، پایداری در برابر نور و تعداد چرخه‌های سوئیچ شدن مد نظر قرار می‌گیرد (۳۶). یکی از مزایای تصویربرداری با وضوح عالی، در روش میکروسکوپی STORM، تهیه تصویر از برهمکنش‌های مولکولی با دقت خیلی زیاد است. انواعی از ترکیبات رنگی قابل سوئیچ با نور و همین طور پروتئین‌های فلورسنت ذکر شده در متن بالا برای تصویربرداری چند رنگ با وضوح بسیار بالا استفاده شده است (۲۹). تصویربرداری سه بعدی با وضوح بسیار بالا و همین طور تهیه تصویر از سلول‌های زنده موضوعات مهمی برای میکروسکوپ STORM هستند. با این روش میکروسکوپی تصاویری سه بعدی و سریع از سلول‌های زنده تهیه شده است که تفکیک کلی برابر با ۳۰ نانومتر در جهت x و y ، ۵۰ نانومتر در جهت z ، و وضوح زمانی (Time Resolutions) با سرعتی برابر ۱ تا ۲ ثانیه داشت (۳۶).

ب- میکروسکوپ PALM

درک این نکته که مولکول‌هایی که در ساختار خود حاوی عوامل برچسب‌دار به عنوان یک منبع نوری نانومقیاس هستند، نکته‌ای کلیدی و ارزشمند است. برای غلبه بر محدودیت ناشی از پراش در روش‌های میکروسکوپی باید فلورسانس مربوط به مولکول‌های قرار گرفته در نزدیکی ناحیه محدود کننده پراش در نمونه را از نظر خاموشی و روشنی تغییر داده و میزان نشر را در سطح خیلی پائین نگه داشته و در ادامه در غالب یک الگوی زمانی پیوسته (شیوه زمان‌های متوالی) تک مولکول‌های موجود در نمونه را به صورت تصادفی روشن و خاموش و مکان‌یابی کرد. بنابراین با گزارش کردن موقعیت مولکول‌های منفرد (تک مولکول) با اندازه ۱ تا ۲ نانومتر (اندازه) به عنوان نشر کننده فلورنست با دقت فضایی بالا (۱۰ تا ۴۰ نانومتر) نمونه مربوطه را تعین هویت کرد (۳۷، ۳۹). مطالعات نشان داده مشکل تصویربرداری معمولی در میکروسکوپ فلورسنت میدان دور این است که همه مولکول‌ها در یک آرایش فضایی معین به طور همزمان برانگیخته شده و فلورسنس می‌شوند. این باعث می‌شود پراش نور مولکول‌های برانگیخته در تصویر ایجاد شده با هم همپوشانی داشته و باعث تداخل در تصویر و کاهش وضوح تصویر شود. از این رو توزیع مولکول‌های منفرد به صورت مجموعه‌هایی پراکنده (از نظر فضایی فواصل پراکندگی آن‌ها بیشتر از ابعاد ایجاد کننده پراش باشد)

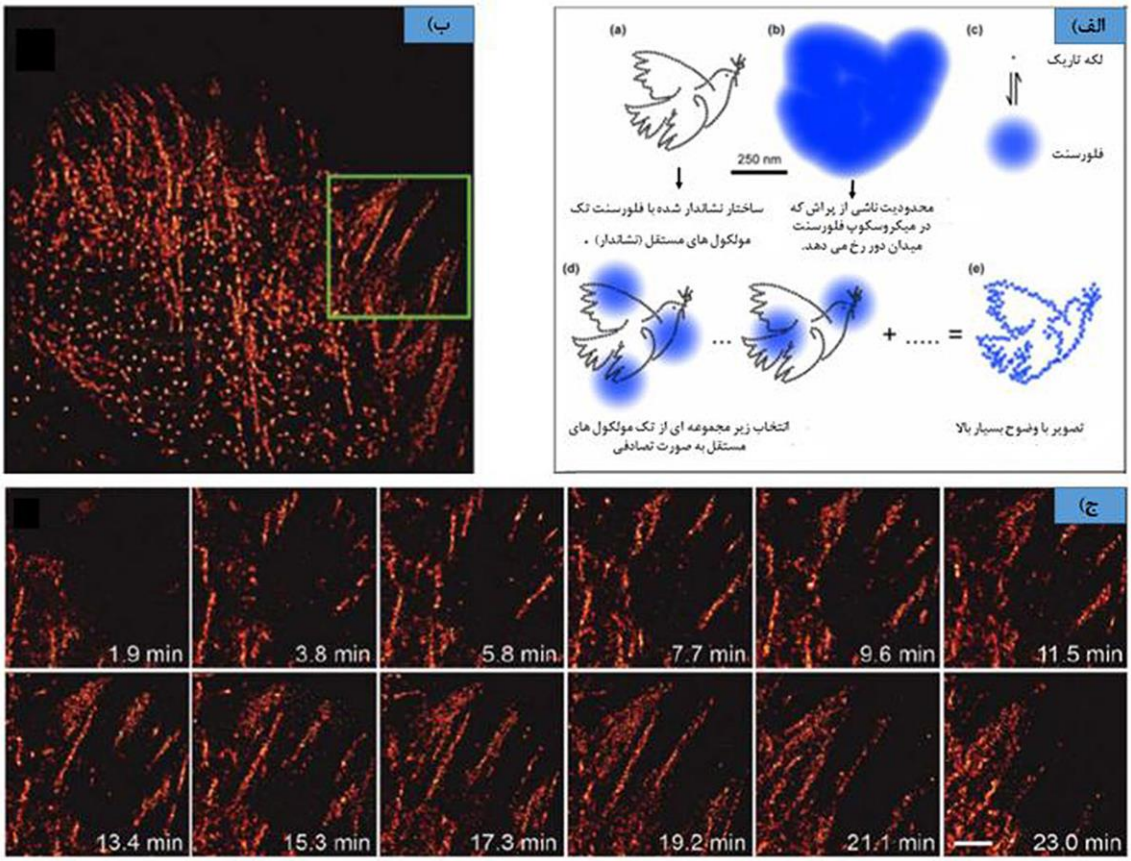
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

باعث می‌شود که مولکوهای نشانگر در حالت روشن بتواند نشر نور داشته در حالی که بقیه هنوز تاریک باقی مانده و موقعیت آن‌ها در یک الگوی زمانی متوالی استخراج شود. این روش از طریق یافتن مراکز مربوط به هر تک مولکول و در ادامه بازسازی تصویر به واسطه خودآرایی مجموعه‌ای از موقعیت‌های تخمین زده انجام می‌شود. توانایی تعیین موقعیت هر مولکول منفرد (شکل ٤)، فرآیندی است که در اصطلاح به این مکان‌یابی Super-localization می‌گویند (٢٤, ٤٠و ٤٣). برای تصاویری که با هم تداخل نمی‌کنند و بنابراین به طور مستقل قابل شناسایی‌اند یک ساز و کار به صورت کنترل فعال (Active control) لازم است، یعنی جایی‌که محقق بتواند بین تعداد انبوهی از مولکول‌های خاموش (تاریک) و کسر خیلی کوچک فلورسنت تعادل برقرار کند. بدین‌صورت که در هر زمان کسر کوچکی از مولکول‌ها روشن و قسمت اعظم آن‌ها به صورت خاموش باقی بماند. مولکول‌های منفرد از طریق نشر تعدادی فوتون در یک الگوی انفجار فوتونی قبل از برگشت به حالت غیر فلورسنت باعث آشکار شدن موقعیت خودشان می‌شوند و بنابراین مولکول‌های اطراف موجود در ساختار را وادار می‌کنند تا به حالت سیگنال‌دهی وارد شده و موقعیت خود را در ترکیب نمونه‌ی مورد مطالعه نشان دهند. همان‌گونه که در بالا ذکر شد، اولین گزارشات تصویربرداری با وضوح بسیار بالا با استفاده از مکان‌یابی تک مولکول‌ها در روش میکروسکوپی STORM و یا PALM بدست آمد. اگر چه در نمونه‌های با ساختار ایستا، اکتساب زمان اهمیت کمتری دارد، برای نمونه‌های پویا باید دوره زمانی مربوط به بازآرایی ساختار لحاظ شود و بنابراین نقش بسیار مهم زمان جلوه‌گر می‌شود. یک راه‌حل این است که از طریق افزایش سرعت سوئیچ شدن در این روش موقعیت‌های بیشتری را در دوره‌های زمانی کوتاه‌تری گزارش کرد. در واقع چندین گروه مولکولی قابل سوئیچ به کار می‌رود تا بازه زمانی را در دامنه بین ١ تا ١٠ ثانیه کاهش دهد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]



شکل ٤- الف) الگوی پیدا کردن مرکز مربوط به هر تک مولکول و بازسازی از طریق خودآرایی لیستی از موقعیت‌های تخمین زده شده. ب) تصویربرداری با میکروسکوپ PALM بر روی سلول زنده. این تصویر مربوط به امتزاج بین پروتئین PAXILLIN (یک گیرنده فرآیند انتقال سیگنال در سلول) با EOSFP (یک پروتئین نشانگر فلورسنت) است. ج) بزرگ‌نمایی از ناحیه سبز رنگ موجود در تصویر ب (شروع چسبندگی کمپلکس) برای مدت زمان ۲۳ دقیقه. مقیاس مورد استفاده ۳ میکرومتر است. استخراج شده از منبع (٤٤).

میکروسکوپ PALM در سال ۲۰۰۶ (۲) بر پایه فعال‌سازی تصادفی، مکان‌یابی و بلیچ‌شدن پروتئین‌های فلورسنت منفرد قابل فعال‌سازی/ شدن با نور ابداع شد. در این میکروسکوپ به طور ویژه تعدادی از پروتئین‌های فلورسنت با نوری که شدت پائینی از پالس‌های لیزری (٤٥٠ نانومتر) دارد فعال شده و در ادامه مولکول‌های فعال شده با طول موج ٥٦١ نانومتر به طور پیوسته برای یک مدت زمان معین تحریک می‌شدند. در هر مرحله فقط کسر کوچکی از مولکول‌های فلورسنت فعال بوده و مابقی پروتئین‌های فلورسنت خاموش شده و در چرخه بعدی شرکت نمی‌کنند. در واقع هنگامی که لیزر ٥٦١ نانومتر برای یک دوره طولانی مدت به سطح نمونه تابیده شود، باعث می‌شود مولکول‌های برانگیخته به صورت دائمی بلیچ شده و بدین طریق در چرخه بعدی شرکت نکنند. پس از تکرار شدن این چرخه فعال‌سازی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

تصادفی برای چندین مرتبه تصویر نهایی با وضوح بسیار بالا بدست می‌آید. در ادامه از طریق محاسبه و ثبت موقعیت مراکز مولکول‌های برانگیخته شده مکان دقیق آن‌ها بدست می‌آید.

۳- تصویر برداری بر پایه بی‌رنگ شدن (بلیچ شدن) و چشمک زدن نشانگرهای فلورسنت

ویژگی‌های رفتاری از قبیل بی‌رنگ شدن و چشمک زدن از خصوصیات ذاتی اغلب نشانگرهای فلورسنت است (۴۵). بر این اساس در سال ۲۰۰۴ دو روش تصویربرداری ابداع شد. این روش‌ها شامل تصویر برداری با وضوح عالی از طریق بلیچ شدن نوری و همچنین مکان‌یابی نانومتری به واسطه‌ی تک مولکول‌های چندگانه (NALMS) است که دقت مکان‌یابی آن تا ابعاد ۵ نانومتری ذکر شده است (۴۶, ۴۷).

یکی از امتیازات روش میکروسکوپی BaLM در قیاس با روش‌های PALM/STORM این است که بر خلاف روش تصویربرداری PALM/STORM به رنگ‌های آلی سوئیچ شونده و پروتئین‌های قابل فعال شدن با نور که از لحاظ تکنیکی با چالش‌هایی روبرو هستند نیازمند نبوده و اساس کار بر خصوصیات رفتاری بلیچ شدن و چشمک زدن نشانگرهای فلورسنت است (٤٨). به این ترتیب در این روش مجموعه‌ای از تصاویر فلورسنس بدست آمده و وقایع بلیچ شدن و چشمک زنی توسط کاستن متعاقب فریم‌ها از توالی تصاویر حاصل می‌شود. به‌دنبال کاستن تصاویر، سیگنال‌های نشری فلورسنس از فلورفورهای منفرد تعیین هویت شده و با دقتی در حد ۵۰ نانومتر مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد (٤٨).

روش SOFI نوع دیگری از تصویربرداری با وضوح بسیار بالا –مشابه با روش میکروسکوپی BaLM است که در آن تفکیک فضایی (Spatial resolution) از طریق نوسانات نوری به میزان ۵ برابر ارتقاء یافته است (٤٩). در تکنیک SOFI از رنگ‌های آلی و نقاط کوانتومی به عنوان مولکول‌های گزارشگر استفاده شده است. در مقایسه با دیگر الگوریتم‌های تصویربرداری، روش SOFI توانسته است به‌عنوان یک رویکرد جذاب برای تصویربرداری ۳ بعدی با سرعت بالا از نمونه‌های زیستی مورد استفاده قرار گیرد (۵۰). دانشمندان طی تحقیقات، تصاویری با وضوحی در حد ۵۰ نانومتر از یک سلول کامل در کسر زمانی ٤ ثانیه بدست آورده‌اند (۵۱). انواعی از روش‌های دیگر مبتنی بر روش استاندارد SOFI ابداع شده و برای بررسی وقایع پویای درون سلول با وضوح زمانی دلخواه در تصاویر به دست آمده استفاده می‌شود (۵۲).

استفاده از تصویربرداری با وضوح بسیار زیاد در زیست شناسی سلولی و مولکولی

زیست شناسان از تکنیک‌های تصویربرداری مبتنی بر فلورسنس با وضوح بسیار بالا در انواعی از زمینه‌های تحقیقاتی از قبیل سازه‌های سلولی، سازمان‌دهی انواع مولکول‌های نامتجانس، سازمان‌دهی پویایی سیناپس‌های عصبی استفاده می‌کنند. ویژگی مشترک همه این حوزه‌ها این است که آن‌ها درگیر در برآیند کلی ناشی از برهمکنش اجزا در شکل‌گیری خصوصیات در مقیاس سلولی هستند. بنابراین تصاویر بدست آمده حاوی اطلاعات اختصاصی از اجزاء سلولی در مقیاس نانومتری هستند که می‌تواند منجربه

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

یک نگرش بنیادی جدید در این زمینه باشد. کاربرد آن‌ها در میکروبیولوژی (۵۳)، عصب شناسی (۵٤, ۵۵) همین‌طور دیگر زمینه‌های پزشکی بسیار زیاد و قابل ملاحظه است. با استفاده از تکنولوژی تصویربرداری با وضوح بسیار بالا اطلاعات و یافته‌های ارزشمندی در حوزه‌هایی مانند بررسی کرموزوم‌ها (۵٦, ۵۸)، نقشه‌یابی ژنوم (۵۹, ٦۰)، انتقالات غشایی (۵, ٦۱, ٦۲)، آلودگی‌های ویروسی (٦۳, ٦۵) و تقسیم سلولی (٦٦, ٦۷) بدست آمده است. با این فن‌آوری می‌توان چگونگی برهمکنش پروتئین‌ها را مشاهده کرد و یا به مطالعه چگونگی انتقال پروتئین‌ها به بخش‌های خاصی از سلول و ضرورت وجود آن‌ها در این بخش‌ها پرداخت.

چالش‌های مرتبط با تصویر برداری با وضوح بسیار بالا

یکی از چالش‌های تصویربرداری با وضوح بسیار بالا از نمونه‌های زیستی و غیرزیستی، مشکلات تکنیکی است که در این بخش به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود. به‌طور کلی دو منبع اصلی برای ایجاد خطا در این روش‌های تصویربرداری وجود دارد. منبع اول که به‌طور معمول در تصویربرداری نقش دارد، شامل چشمک زدن ذاتی مولکول نشانگر است که منجر به خطای شمارش بیش از حد می‌شود. این در حالی است که فعال‌سازی غیر قابل اجتناب چند مولکول به‌طور همزمان در یک ناحیه محدودیت پراش، باعث پنهان ماندن مولکول‌ها و شمارش تعداد کمتری از آن-ها می‌شود (٦۸, ٦۹). بنابراین یک الگوی اختصاصی از فعال‌سازی و مدل‌سازی دقیق برای تعادل بین حالت بیشتر و کمتر از حد معمول در ارتباط با شمارش لازم است (۷۰). چالش دیگر در تصویربرداری با وضوح بسیار بالا محدودیت تفکیک زمانی آن است. مقیاس زمانی برای تصاویر با وضوح بسیار بالا به طور معمول در بازه زمانی چند ثانیه تا چند دقیقه است. به‌عنوان مثال به دست آوردن تفکیک فضایی در ۵۰ تا ۷۰ نانومتری در STORM به‌طور معمول چندین هزار فریم و یا ده‌ها ثانیه نیاز دارد (۷۱). این در حالی است که این مقیاس زمانی برای بسیاری از وقایع پویا و ویژگی‌های ساختاری طولانی بوده و برای بدست آوردن سیگنال‌های اطلاعاتی معنی‌دار کارآمد نیست. بنابراین روش‌های تصویربرداری سریع‌تر به طور قطع مناسب‌تر هستند. اصولا روش‌های تصویربرداری مبتنی بر مکان‌یابی تک مولکول از قبیل STORM و PALM بر پایه تصویربرداری قابل تکرار و مکان‌یابی زیر مجموعه‌های پراکنده مولکول‌های فعال می‌باشد. برای رسیدن به استاندارد نایکوئیست (واحد استاندارد در تایید این‌که نقاط مجاور که مکان‌یابی شده‌اند، از حد تفکیک فضایی به هم نزدیکتر هستند)، وقایع فعال سازی تک مولکول باید هزاران بار ذخیره شود تا اطمینان حاصل شود نقاط مجاور مکان‌یابی شده یک برابر از تفکیک فضایی مورد نظر نزدیک‌تر شده و در نتیجه وضوح زمانی را تا حدود زیادی محدود می‌کند (۷۲).

شدت برانگیختی بالاتر می‌تواند سرعت سوئیچ شدن را افزایش دهد و در نتیجه باعث بهبود یافتن وضوح زمانی شود اما از طرفی سبب آسیب نوری شود (۷۳). علاوه براین در مورد پروتئین‌های فلورسنت سریع شدن نرخ سوئیچ شدن می‌تواند سبب تخریب سیگنال شود. یک رویکرد جایگزین افزایش تراکم

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

فلورفورهای فعال شده است، به‌طوری که هر فریم دوربین مولکول‌های بیشتری را در نمونه ذخیره کند. با این وجود این تراکم بالای لکه‌های فلورسنت سبب هم‌پوشانی سیگنال‌ها شده و بنابراین الگوریتم‌های مکان‌یابی کلاسیک نمی‌تواند کارآمد بوده و مورد استفاده قرار گیرد. الگوریتم‌های مکان‌یابی جدید سرعت تصویربرداری را بهبود بخشیده و به دنبال آن وضوح زمانی ۳ ثانیه مبتنی بر تکنولوژی بازیافت سیگنال‌های پراکنده و ضعیف را سبب شود (۷٤, ۷۵).

با توجه به خودآرایی ۳ بعدی سازه‌های زیستی، چالش دیگر تصویربرداری فلورسنت با وضوح بسیار بالا تهیه تصاویر ۳ بعدی با وضوح نانومتری در همه ابعاد است. ساده‌ترین راه برای ایجاد تصاویر ۳ بعدی با وضوح بسیار زیاد تهیه یک ردیف برش‌های مکانیکی از بافت در ترکیب با تکنیک‌های استاندارد است. در سال ۲۰۰۸ با استفاده از این استراتژی، بازسازی تصویر ۳ بعدی حاصل از روش STED، با وضوحی کمتر از ۸۰ نانومتر در همه جهات بدست آمد (۷٦). در تکنیک‌های پیشرفته‌تر در روش میکروسکوپی STED وضوحی برابر با ۳۰ نانومتر را ایجاد کردند (۷۷). یکی دیگر از راهکارهای بهبود روش‌های تصویربرداری با وضوح بسیار زیاد استفاده از نشانگرهای فلورسنتی با طول عمر بیشتر و درخشان‌تر است. برای افزایش نشر از برچسب‌های برانگیخته شده چندین مسیر شامل مهندسی کردن پروتئین‌های فلورسنت (۷۸)، بهبود یافتن تکنیک‌ها برای افزایش اختصاصیت، برچسب گذاری اهداف داخل سلولی با فلورفورهای آلی (۷۹) و توسعه روش‌ها مد نظر قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری

با بهبود یافتن روش‌ها و در دسترس بودن میکروسکوپ فلورسنت با تصویربرداری با وضوح بسیار بالا، کاربرد این تکنولوژی قدرتمند در دامنه‌ی وسیعی از تحقیقات زیست شناسی می‌تواند مورد استفاده قرار گرفته و منشاء نگرشی جدید در حیات موجودات زنده باشد. ارتقاء روش‌های تصویربرداری با وضوح بسیار زیاد در میکروسکوپ نوری شکاف بین قدرت تفکیک آن‌ها را در تقابل با روش‌های مبتنی بر میکروسکوپ الکترونی از بین برده است. امروزه این روش‌های میکروسکوپی که مبتنی بر توالی پیوسته‌ای از مکان‌یابی تک مولکول‌های مستقل است توسعه یافته و تبدیل به یک ابزار ۳ بعدی منحصر به فرد برای مطالعه دنیای پویای سلولی شده و کلیدی برای اختصاصیت بالاتر مولکولی و حداقل نگه داشتن حالت تهاجمی برای بافت‌های موجودات زنده است. با بهره گیری از این تکنولوژی جدید چگونگی برهمکنش پروتئین‌ها با یکدیگر، نحوه انتقال پروتئین‌ها به بخشهای خاصی از سلول و ضرورت حضور آن‌ها در بخش‌های مختلف سلول، قابل مشاهده و مطالعه خواهد بود. به این‌ترتیب به کارگیری این روش‌ها برای درک این ساز و کارها و ابداع روش‌های درمانی جدید در تمام حوزه‌های پژوهشی نانوزیست فناوری بسیار ضروری و راه‌گشاست.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

References

1- **Hao X, Kuang C, Gu Z, Wang Y, Li S, Ku Y, Li Y, Ge J, Liu X.** 2013. From microscopy to nanoscopy via visible light. Light: Science & Applications **2:**e108.

2- **Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF.** 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science **313:**1642-1645.

3- **Gustafsson MG.** 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. J. Microsc. **198:**82-87.

4- **Hell SW, Wichmann J.** 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Opt. Lett. **19:**780-782.

5- **Bates M, Huang B, Dempsey GT, Zhuang X.** 2007. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. Science **317:**1749-1753.

6- **Heintzmann R, Jovin TM, Cremer C.** 2002. Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement. JOSA A **19:**1599-1609.

7- **valen dv.** 2009 .point spread function workshop.

8- **Rittweger E, Rankin B, Westphal V, Hell S.** 2007. Fluorescence depletion mechanisms in super-resolving STED microscopy. Chem. Phys. Lett. **442:**483-487.

9- **Huang B, Bates M, Zhuang X.** 2009. Super resolution fluorescence microscopy. Annu. Rev. Biochem. **78:**993.

10- **Dyba M, Jakobs S, Hell SW.** 2003. Immunofluorescence stimulated emission depletion microscopy. Nature Biotechnology **21:**1303-1304.

11- **Pohl DW, Denk W, Lanz M.** 1984. Optical stethoscopy: Image recording with resolution λ/20. Appl. Phys. Lett. **44:**651-653.

12- **Donnert G, Keller J, Wurm CA, Rizzoli SO, Westphal V, Schönle A, Jahn R, Jakobs S, Eggeling C, Hell SW.** 2007. Two-color far-field fluorescence nanoscopy. Biophys. J. **92:**L67-L69.

13- **Meyer L, Wildanger D, Medda R ,Punge A, Rizzoli SO, Donnert G, Hell SW.** 2008. Dual-Color STED Microscopy at 30-nm Focal-Plane Resolution. Small **4:**1095-1100.

14- **Willig KI, Stiel AC, Brakemann T, Jakobs S, Hell SW.** 2011. Dual-label STED nanoscopy of living cells using photochromism. Nano Lett.s **11:**3970-3973.

15- **Hein B, Willig KI, Wurm CA, Westphal V, Jakobs S, Hell SW.** 2010. Stimulated emission depletion nanoscopy of living cells using SNAP-tag fusion proteins. Biophys. J . **98:**158-163.

16- **Westphal V, Rizzoli SO, Lauterbach MA, Kamin D, Jahn R, Hell SW.** 2008. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. Science **320:**246-249.

17- **Pellett PA, Sun X, Gould TJ, Rothman JE, Xu M-Q, Corrêa IR, Bewersdorf J.** 2011. Two-color STED microscopy in living cells. Biomed .Opt. Express **2:**2364-2371.

18- **Klar TA, Jakobs S, Dyba M, Egner A, Hell SW.** 2000. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. Proceedings of the National Academy of Sciences **97:**8206-8210.

19- **Hell SW, Dyba M ,Jakobs S.** 2004. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. Curr. Opin. Neurobiol. **14:**599-609.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

20- **Vaughan JC, Zhuang X.** 2011. New fluorescent probes for super-resolution imaging. Nat. Biotechnol. **29:**880-881.

21- **Chang H, Zhang M, Ji W ,Chen J, Zhang Y, Liu B, Lu J, Zhang J, Xu P, Xu T.** 2012. A unique series of reversibly switchable fluorescent proteins with beneficial properties for various applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **109:**4455-4460.

22- **Brakemann T, Stiel AC, Weber G ,Andresen M, Testa I, Grotjohann T, Leutenegger M, Plessmann U, Urlaub H, Eggeling C.** 2011. A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching. Nat. Biotechnol. **29:**942-947.

23- **Schermelleh L, Carlton PM, Haase S, Shao L, Winoto L, Kner P, Burke B, Cardoso MC, Agard DA, Gustafsson MGL, Leonhardt H, Sedat JW.** 2008. Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy. Science **320:**1332-1336.

24- **Thompson RE, Larson DR, Webb WW.** 2002. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. Biophysical journal **82:**2775-2783.

25- **Mennella V, Keszthelyi B, McDonald KL, Chhun B, Kan F, Rogers GC, Huang B, Agard DA.** 2012. Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization. Nature Cell Biology **14:**1159-1168.

26- **van de Linde S, Heilemann M, Sauer M.** 2012. Live-cell super-resolution imaging with synthetic fluorophores .Annu. Rev. Phys. Chem.s **63:**519-540.

27- **Patterson G, Davidson M, Manley S, Lippincott-Schwartz J.** 2010. Superresolution imaging using single-molecule localization. Annu. Rev. Phys. Chem. **61:**345.

28- **Rust MJ, Bates M, Zhuang X.** 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Nat. Methods **3:**793-796.

29- **Bates M, Huang B, Zhuang X.** 2008. Super-resolution microscopy by nanoscale localization of photo-switchable fluorescent probes. Curr. Opin. Chem. Biol. **12:**505-514.

30- **Bates M, Blosser TR, Zhuang X.** 2005. Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch. Physical review letters **94:**108101.

31- **Heilemann M, van de Linde S, Schüttpelz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, Tinnefeld P, Sauer M** .۲۰۰۸ .Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. Angewandte Chemie International Edition **47:**6172-6176.

32- **Fölling J, Belov V, Kunetsky R, Medda R, Schönle A, Egner A, Eggeling C, Bossi M, Hell SeW.** 2007. Photochromic rhodamines provide nanoscopy with optical sectioning. Angew. Chem. Int. Ed. **46:**6266-6270.

33- **Wiedenmann J, Ivanchenko S, Oswald F, Schmitt F, Röcker C, Salih A, Spindler K-D, Nienhaus GU.** 2004. EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.s **101:**15905-15910.

34- **Patterson GH, Lippincott-Schwartz J.** 2002. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. Science **297:**1873-1877.

35- **McKinney SA, Murphy CS, Hazelwood KL, Davidson MW, Looger LL.** 2009. A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. Nat. Methods **6:**131-133.

36- **Dempsey GT, Vaughan JC, Chen KH, Bates M, Zhuang X.** 2011. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. Nat. Methods **8:**1027-1036.

37- **Moerner WE.** 2010. Single-molecule optical spectroscopy and imaging: from early steps to recent

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

advances, p. 25-60, Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology. Springer Berlin Heidelberg.

38- **Moerner W.** 2007. New directions in single-molecule imaging and analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **104:**12596-12602.

39- **Hell SW.** 2009. Microscopy and its focal switch. Nat. Methods **6:**24-32.

40- **Moerner W, Kador L.** 1989 .Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. Phys. Rev. Lett. **62:**2535.

41- **Moerner W, Basche T.** 1993. Optical spectroscopy of single impurity molecules in solids. Angew. Chem. Int. Ed. **32:**457-476.

42- **Betzig E, Chichester RJ.** 1993. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. Science **262:**1422-1425.

43-m**Bobroff N.** 1986. Position measurement with a resolution and noise-limited instrument. Rev. Sci. Instrum. **57:**1152-1157.

44- **Shroff H, Galbraith CG, Galbraith JA** ,**Betzig E.** 2008. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. Nature Methods **5:**417-423.

45- **Bopp MA, Jia Y, Li L, Cogdell RJ, Hochstrasser RM.** 1997. Fluorescence and photobleaching dynamics of single light-harvesting complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **94:**10630-10635.

46- **Qu X, Wu D, Mets L, Scherer NF.** 2004. Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101:**11298-11303.

47- **Gordon MP, Ha T, Selvin PR.** 2004 .Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101:**6462-6465.

48- **Burnette DT, Sengupta P, Dai Y, Lippincott-Schwartz J, Kachar B.** 2011. Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **108:**21081-21086.

49- **Dertinger T, Colyer R, Iyer G, Weiss S, Enderlein J.** 2009. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). Proc. Natl. Acad .Sci. U. S. A. **106:**22287-22292.

50- **Geissbuehler S, Dellagiacoma C, Lasser T.** 2011. Comparison between SOFI and STORM. Biomed. Opt. Express **2:**408-420.

51- **Cox S, Rosten E, Monypenny J, Jovanovic-Talisman T, Burnette DT, Lippincott-Schwartz J, Jones GE, Heintzmann R.** 2012. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics. Nat. Methods **9:**195-200.

52- **Cho S, Jang J, Song C, Lee H, Ganesan P, Yoon T-Y, Kim MW, Choi MC, Ihee H, Do Heo W.** 2013. Simple super-resolution live-cell imaging based on diffusion-assisted Forster resonance energy transfer. Sci. Rep. **3**.

53- **Coltharp C, Xiao J.** 2012. Superresolution microscopy for microbiology. Cell. Microbiol. **14:**1808-1818.

54- **Sigrist SJ, Sabatini BL.** 2012. Optical super-resolution microscopy in neurobiology. Curr. Opin. Neurobiol. **22:**86-93.

55- **Tønnesen J, Nägerl UV.** 2013. Superresolution imaging for neuroscience. Exp. Neurol. **242:**33-40.

56- **Zessin PJ, Finan K, Heilemann M.** 2012. Super-resolution fluorescence imaging of chromosomal DNA. J. Struct. Biol.s **177:**344-348.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

57- **Wang W, Li G-W, Chen C, Xie XS, Zhuang X.** 2011. Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria. Science **333:**1445-1449.

58- **Matsuda A, Shao L, Boulanger J, Kervrann C, Carlton PM, Kner P, Agard D, Sedat JW** .۲۰۱۰ . Condensed mitotic chromosome structure at nanometer resolution using PALM and EGFP-histones. PloS one **5:**e12768.

59- **Baday M, Cravens A, Hastie A, Kim H, Kudeki DE, Kwok P-Y, Xiao M, Selvin PR.** 2012. Multicolor super-resolution DNA imaging for genetic analysis. Nano Lett. **12:**3861-3866.

60- **Lubeck E, Cai L.** 2012. Single-cell systems biology by super-resolution imaging and combinatorial labeling. Nat. Methods **9:**743-748.

61- **Wu M, Huang B, Graham M, Raimondi A, Heuser JE, Zhuang X, De Camilli P.** 2010 .Coupling between clathrin-dependent endocytic budding and F-BAR-dependent tubulation in a cell-free system. Nat. Cell Biol.s **12:**902-908.

62- **Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X.** 2008. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. Science **319:**810-813.

63- **Chojnacki J, Staudt T, Glass B, Bingen P, Engelhardt J, Anders M, Schneider J, Müller B, Hell SW, Kräusslich H-G.** 2012. Maturation-dependent HIV-1 surface protein redistribution revealed by fluorescence nanoscopy. Science **338:**524-528.

64- **Pereira CF, Rossy J, Owen DM, Mak J, Gaus K.** 2012. HIV taken by STORM: super-resolution fluorescence microscopy of a viral infection. Virol. J. **9:**84.

65- **Malkusch S, Muranyi W, Müller B, Kräusslich H-G, Heilemann M.** 2013. Single-molecule coordinate-based analysis of the morphology of HIV-1 assembly sites with near-molecular spatial resolution. Histochem. Cell Biol. **139:**173-179.

66- **Lüders J.** 2012. The amorphous pericentriolar cloud takes shape. Nat. Cell Biol. **14:**1126-1128.

67- **Mennella V, Keszthelyi B, McDonald K, Chhun B, Kan F, Rogers G, Huang B, Agard D.** 2012. Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization. Nat. Cell Biol. **14:**1159-1168.

68- **Annibale P, Vanni S, Scarselli M, Rothlisberger U, Radenovic A.** 2011. Quantitative photo activated localization microscopy: unraveling the effects of photoblinking. PloS one **6:**e22678.

69- **Lee S-H, Shin JY, Lee A, Bustamante C.** 2012. Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **109:**17436-17441.

70- **Sahl SJ, Moerner W.** 2013. Super-resolution fluorescence imaging with single molecules. Curr. Opin. Struct. Biol. **2**.۷۸۷-۳:۷۷۸

71- **Zhu L, Zhang W, Elnatan D, Huang B.** 2012. Faster STORM using compressed sensing. Nat. Methods **9:**721-723.

72- **Shroff H, Galbraith CG, Galbraith JA, Betzig E.** 2008. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. Nat. Methods **5:**417-423.

73- **Jones SA, Shim S-H, He J, Zhuang X.** 2011. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. Nat. Methods **8:**499-505.

74- **Holden SJ, Uphoff S, Kapanidis AN.** 2011. DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy. Nat. Methods **8:**279-280.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

75- **Quan T, Zhu H, Liu X, Liu Y, Ding J, Zeng S, Huang Z-L.** 2011. High-density localization of active molecules using Structured Sparse Model and Bayesian Information Criterion. Opt. Express **19:**16963-16974.

76- **Punge A, Rizzoli SO, Jahn R, Wildanger JD, Meyer L, Schönle A, Kastrup L, Hell SW.** 2008. 3D reconstruction of high-resolution STED microscope images. Microsc. Res. Tech. **71:**644-650.

77- **Schmidt R, Wurm CA, Punge A, Egner A, Jakobs S, Hell SW.** 2009. Mitochondrial cristae revealed with focused light. Nano Lett. **9:**2508-2510.

78- **Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, Davidson MW, Tsien RY.** 2008. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. Nat. Methods **5:**545-551.

79- **Wombacher R, Cornish VW.** 2011. Chemical tags: applications in live cell fluorescence imaging. J. Biophotonicss **4:**391-402.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]

Recent progress in upgrading optical microscopy resolution: an opening into biological observations at nanoscale

Ali Dinari[1], Elnaz Tamjid[2*]

1- Ph.D. of Nanobiotechnology, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor of Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

tamjid@modares.ac.ir

Abstract

The advancement of nanotechnology, as a promising novel technology, have been associated with concerns about biosafety and bioenvironmental issues. Specially, since this technology raises the claim of material manipulation in cellular-molecular-level, and improving biological functions of biomaterials with medical and biotechnological aims. In this regard, the safety of nanostructures and sub-cellular components according to the biological observations, and accurate study of biological mechanisms at the nanometer scale is of critical importance. The advantage of optical microscopy as an important tool in development of science is the ability to observe the living sample models, with minimal disruption to their functions, flexibility, sensitivity, and specificity. However, the limitation is the diffraction of light and its effect on the resolution. Recently, improvement of novel super-resolution imaging methods relying on molecules consisting of a labeled structure as nanometer source of light, has led to a significant reduction of resolution gap between fluorescent and electron microscopy. The images obtained by super-resolution technique contain valuable information in areas such as chromosome studies, genome mapping, membrane transport, cell division, viral infection and cytotoxicity. This article introduces the latest scientific achievements of optical microscopy resolution improvement to the nanoscale with hope to upgrade the general information in different field of biology and medicine.

Keywords: optical fluorescent microscopy, resolution, diffraction, nanometer scale, biosafety.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.2.3]